

受精鶏卵を用いたヒト骨軟部悪性腫瘍の 転移巣に対する抗がん剤感受性試験

金沢大学医学部整形外科科学講座 (主任: 富田勝郎教授)

高 木 泰 孝

骨軟部悪性腫瘍の治療成績の向上のためには、原発腫瘍のみならず転移腫瘍に対する有効な治療方法を開発する必要がある。本研究では骨軟部悪性腫瘍の転移実験法ならびに転移巣治療実験法の確立を目指し、受精鶏卵を用いる腫瘍移植系(受精鶏卵法)によるヒト腫瘍細胞の人工転移実験系の有用性を検討した。孵卵10日目の受精鶏卵の漿尿膜上の血管に 1×10^6 個の腫瘍細胞を移植し、7日後に胎児肝および肺を摘出しDNAを抽出した。転移ヒト腫瘍細胞の特異的且つ定量的な検出方法として、転移腫瘍に含まれるヒトDNAの特定領域を特異的DNA増幅反応(polymerase chain reaction, PCR)法により増幅した後、増幅DNA断片をサザンブロット法にて検出および解析した。本法を用いて骨軟部悪性腫瘍培養株の転移能を検討した結果、線維肉腫細胞株ではHT-1080が、骨肉腫細胞株ではMNNG/HOSとSK-ES-1が高い転移能を示した。さらにHT-1080およびMNNG/HOSを移植した鶏卵胎児においては単位重量当りの転移細胞が肺より肝の方がそれぞれHT-1080で約3倍、MNNG/HOSで約10倍上回っていた。それに対して、SK-ES-1では肺および肝における転移細胞数はほぼ同程度で、肺への転移指向性がHT-1080やMNNG/HOSに比べて高いことが示唆された。腫瘍移植7日後の肝および肺の組織学的所見ではこれらの腫瘍細胞の転移が多数観察され、PCR法による検出結果と一致した。転移巣に対する抗がん剤の感受性を検討する目的で移植後3日目に抗がん剤を漿尿膜上の血管内に投与した。HT-1080、MNNG/HOSおよびSK-ES-1の転移巣はいずれもアドリマイシン(adriamycin, ADM)とマイトマイシンC(mitomycinC, MMC)に高い感受性を示した。またシスプラチン(cis-platinum, CDDP)、サイクロフォスファミド(cyclophosphamide, CPM)およびビンブラスチン(vinblastine, VLB)に対する転移巣の感受性は各細胞株により異なり、SK-ES-1はCDDPおよびCPMに、HT-1080はVLBに高い感受性を示した。しかし、MNNG/HOSの転移巣は同投与量のCDDP、CPMおよびVLBに対し感受性を示さなかった。MNNG/HOS細胞を移植した鶏卵胎児肝の経時的な組織学的所見では、腫瘍細胞は2時間および8時間後でも微小血管内に存在していたが、12時間後には腫瘍細胞は血管内皮細胞内に侵入していた。さらに、22時間および51時間後では分裂増殖が認められ、7日後では転移巣を多数形成していた。転移巣形成の抑制を目的に、受精鶏卵にMNNG/HOS細胞を移植した後早期にMMCとVLBを投与した。MMCを移植2時間後に投与した場合では91.9%の肝転移巣抑制効果を示し、24時間と72時間後では各々83.2%および51.8%の抑制率を示した。一方、VLB投与群の転移巣抑制率は移植2時間後の投与では-2.2%、72時間後の投与では10.4%であった。このように腫瘍細胞移植後早期に有効な抗がん剤を投与することにより転移を抑制することが可能であることが示された。受精鶏卵法はヒト骨軟部悪性腫瘍の転移、浸潤の機構解明のための転移実験系として、また転移巣に対する治療法の開発にも有用な実験系になるものと考えられた。

Key words human bone and soft tissue tumor cell, metastasis, polymerase chain reaction, chemosensitivity test, chick embryo

骨軟部悪性腫瘍における最も憂慮されるべき予後因子の一つは診断時における転移の有無である。しかしながら、現在のがん医療における転移がんの一般的な検出限界は直径1cmの腫瘍までとされており¹⁾、この検出限界よりもさらに小さい微小転移がんの検出法は未だ確立されていない。従って、がんであると診断が下された段階で微小転移がんが存在すると仮定した全身の治療法が施行されているのが現状である。特に骨軟部悪性腫瘍領域においては強力かつ有効な化学療法の支援がその治療成績の向上に大きく貢献していることから²⁻⁵⁾、全身の治療

法であるがん化学療法は微小転移がんの治療に有用な手段になり得ると考える。一方、がん化学療法は未だ完成されたものではなく、既存の抗がん剤の投与のみでは完全に転移を抑制することは難しい。転移を阻止し転移がんを効果的に治療するためには、がん細胞の転移の機構に基づいた薬剤または治療法を新たに開発する必要がある。これまでの転移研究の大部分は転移現象の解析であり、転移がんの治療に関する報告は極めて少ない。これは有用な転移実験モデル系が確立されていないことによる原因の一つがある。本研究では骨軟部悪性腫瘍の転移実験系な

平成5年4月20日受付、平成5年5月17日受理

Abbreviations: ADM, adriamycin; CDDP, cis-platinum; CPM, cyclophosphamide; EDTA, ethylenediamine-tetraacetic acid; H. E., hematoxylin and eosine; MMC, mitomycin C; MMP, matrix metalloproteinase; MTT, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide; OD, optical density; PBS, phosphate-buffered

らびに転移巣治療実験系の確立を目指し、受精鶏卵法によるヒト骨軟部悪性腫瘍細胞の転移実験および微小転移巣に対する抗がん剤感受性試験を検討した。

材料および方法

I. 腫瘍細胞と培養

本研究の転移実験に用いたヒト腫瘍細胞株は、線維肉腫細胞 HT-1080[®] [American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA から購入] と以下の6種の骨肉腫細胞、当教室で樹立し継代してきたヒト骨肉腫由来細胞 (human osteogenic sarcoma Takase strain, OST)⁷⁾, MNNG/HOS[®] (ATCC から購入), MG-63[®] (ATCC から購入), KHOS-312H[®] (ATCC から購入), SK-ES-1¹¹⁾ (ATCC から購入), U-2OS¹²⁾ (住友製薬研究所, 大阪より供与) の計7種類である。組織培養液は10% (v/v) 非働化ウシ胎児血清 (fetal calf serum, FCS) (GIBCO, Grand Island, NY, USA) と0.3mg/ml グルタミン (日本製薬, 東京) を含む RPMI-1640 培地 (ニプロ, 大阪) である。各細胞は組織培養液中において、5% CO₂ 濃度、37℃で培養した。移植用の細胞浮遊液は以下のように調整した。0.02% トリプシン (GIFCO, Detroit, Mich., USA)-0.2% エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) を含む0.15M リン酸緩衝生理食塩液 (phosphate-buffered saline, PBS) を用いて細胞を剥離した後、組織培養液を用いて細胞浮遊液 1×10^7 個/ml を作製した。移植に用いた腫瘍細胞の浮遊液は、トリパンブルー色素排除試験法により、90%以上の生細胞があることを確認した。

II. 実験動物

本研究で腫瘍移植の宿主動物として用いた受精鶏卵 (プリマスロック種×ホワイトレグホン種) は後藤鶏卵場 (岐阜) より購入し、加湿した孵卵器中37℃で孵卵させた。

III. 腫瘍細胞の移植方法

受精鶏卵の模式図を図1に示し、腫瘍細胞の移植方法を以下に記述する。孵卵10日目の鶏卵を透光し、漿尿膜上の血管の位置を定め、そこを中心に回転式のヤスリを用いて卵殻に1cm×0.5cm程度の傷を付け、ピンセットを用いて卵殻を除去した。露出した卵殻膜に流動パラフィン (Merck, Darmstadt, Germany) を滴下し血管を見やすくし、30ゲージ針の付いた注射器を用いて 1×10^6 個 (0.1ml) の腫瘍細胞を漿尿膜上の血管内に移植した。

IV. 転移巣治療実験

抗がん剤による治療実験を行なう場合には腫瘍細胞移植3日

後、即ち孵卵13日目に、Ⅲに記述した方法で卵殻の別の部位に窓を開け、30ゲージの注射針を用いて0.1mlの抗がん剤を投与した。薬剤濃度は臨床投与量を参考にし、鶏卵胎児の平均体重 (孵卵13日目で5.1g) に換算して決定した (表1)。抗がん剤としてアドリマイシン (adriamycin, ADM) (協和薬業, 東京), シスプラチン (cis-platinum, CDDP) (日本化薬, 東京), サイクロホスファミド (cyclophosphamide, CPM) (塩野義製薬, 大阪), ビンブラスチン (vinblastine, VLB) (塩野義製薬), マイトマイシン C (mitomycin C, MMC) (三共, 東京), エトポサイド (etoposide, VP-16) (ブリistol・マイヤーズ・スクイブ, 東京) を用いた。移植後7日目即ち孵卵17日目に胎児を解剖し、摘出した肝および肺から DNA を抽出した。

V. DNA 抽出と鋳型 DNA の調製

ヒト腫瘍培養細胞または鶏卵胎児より摘出した肝 (約0.5g) および肺 (約0.15g) からの DNA 抽出は、以下に示す方法で行なった¹³⁾。鶏卵肝及び肺を4mlの0.1M 塩化ナトリウム; 0.2M ショ糖; 0.01M EDTA; 0.3M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) 中で破碎した。各破碎液はファルコン2059チューブ (Becton Dickinson, NJ, USA) に入れ、250μlの10%ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS) を加え攪拌し、65℃の温浴中において30分間加熱した。さらに、600μlの8M 酢酸カリウム pH5.2 を加え、攪拌後水中に60分間静置した。氷冷後、4℃, 11,000rpm において20分間遠心し、上清を新たなチューブに回収した。クロロホルム 2ml, Tris-EDTA (TE) 緩衝液

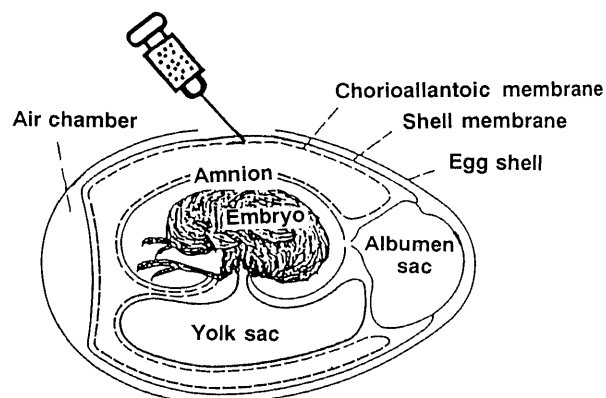


Fig. 1. Schema of the fertilized egg. Tumor cells were injected into the chorioallantoic membrane (CAM) vein of 10-day-old chick embryos with a 30 gauge needle through the shell membrane.

Table 1. Antitumor drugs and doses for the chemosensitivity test

Drug	Clinical dose	Experimental dose (μg/egg)
Adriamycin (ADM)	60 mg/m ²	10,20,40,80
Cis-platinum (CDDP)	100 mg/m ²	5,10,20
Cyclophosphamide (CPM)	1200 mg/m ²	100,250,500
Etoposide (VP-16)	60 mg/m ²	20,40
Mitomycin C (MMC)	1 mg/kg	20,40
Vinblastine (VLB)	0.2 mg/kg	0.5,1

The experimental doses were determined according to the clinical doses.

saline; PCR, polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, saline sodium citrate; TE, Tris EDTA; VLB, vinblastine; VP-16, etoposide

[10mM Tris-HCl (pH7.4), 0.1mM EDTA (pH8.0)] 飽和フェノール 2ml を加え攪拌後, 3,000rpm において15分間遠心した。水層にクロロホルム 4ml を加え攪拌後, 3,000rpm において15分間遠心を行なった。分取した水層に 8ml のエタノールを加え, 4℃, 3,000rpm において15分間遠心し, DNA を沈殿として得た。沈殿は 5ml の80%エタノールで洗い, 減圧乾燥した後 2ml の TE 緩衝液に溶解した。各 DNA 溶液にリボヌクレアーゼ A (Sigma, St. Louis, MO, USA) 100 μ g を加え 37℃, 30分間反応させた後, 3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) 200 μ l を加え, TE 緩衝液飽和フェノール-クロロホルム (1:1) 2ml にて 1 回 (3,000rpm, 15分間), クロロホルム 2ml にて 1 回 (3,000rpm, 10分間) 抽出を行なった。分取した水層に 5ml のエタノールを加え 3,000rpm にて15分間遠心しエタノール沈殿を行なった。DNA は, 80%のエタノール 2ml で洗い, 減圧乾燥した後, TE 緩衝液に溶解した。各 DNA の 260nm における吸光度 (optical density, OD) を測定して DNA 濃度 (1OD=50 μ g/ml) を求めた後, 滅菌蒸留水を用いて 100 μ g/ml に調製し, これを *Taq* DNA ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA) を用いる特異的 DNA 増幅反応 (polymerase chain reaction, PCR) の鋳型 DNA として用いた。

VI. プライマーおよびプローブ用オリゴヌクレオチドの作製

PCR プライマーとプローブ用オリゴヌクレオチドは Endo ら¹⁴⁾ の報告に準じ, ヒト β -グロビン遺伝子576塩基対を特異的に増幅する Hu β -1: 5'-AGAGCCATCTATTGCTTACA-3' と Hu β -8: 5'-TATGACATGAACCTTAACCAT-3', およびプローブ用オリゴヌクレオチド, Hu β -2: 5'-ACACAACCTGTGTTC-ACTAGC-3', を DNA 合成装置 PCR メイト (Applied Biosystems, CA, USA) により合成した。プローブ DNA 13pmol に対し [γ -³²P] ATP 50 μ Ci (Amersham, Greenwhich, CT, USA), ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液 [50mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM 塩化マグネシウム, 5mM ジチオトレイトール, 0.1mM スペルミジンおよび 0.1mM EDTA (pH8.0)], 10単位 T4 キナーゼ (宝酒造, 京都) および滅菌蒸留水を加え全量 20 μ l とし, 37℃において45分間反応させた後ハイブリダイゼーションに用いた。

VII. PCR 反応

調製した鋳型 DNA 1 μ g に対して PCR 反応緩衝液 [10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM 塩化カリウム, 1.5mM 塩化マグネシウム], デオキシリボヌクレオチド混合液 [デオキシアデノシン三リン酸 (deoxyadenosine 5'-triphosphate, dATP), デオキングアノシン三リン酸 (deoxyguanosine 5'-triphosphate, dGTP), デオキシシチジン三リン酸 (deoxycytidine 5'-triphosphate, dCTP), デオキシチミジン三リン酸 (deoxythymidine 5'-triphosphate, dTTP) 各 200 μ M], *Taq* DNA ポリメラーゼ 2.5 単位, 各々 1 μ M のプライマーを加え, 滅菌蒸留水により全量 100 μ l に調整した。加熱の際に起きる反応液の蒸発を防ぐため, 反応液に 100 μ l のミネラルオイル (Sigma) を重層した。反応には DNA サーマルサイクラー (Perkin-Elmer Cetus) を使用し, 熱変性を 94℃, 1分間, アニーリングを 55℃, 2分間, DNA の伸長を 72℃, 1分間とし, これを 1 サイクルとして, 26 サイクル繰り返した。反応終了後, 3,000rpm において数秒間遠心した後, 上層のミネラルオイルを除去し, クロロホルム 100 μ l を加え振盪し, 上層に増幅後の DNA 溶液を得た。

VIII. 増幅 DNA 断片の検出

増幅後の DNA 溶液に 10 μ l の 3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) および 300 μ l のエタノールを加え, 4℃, 15,000rpm にて20分間遠心し DNA を沈殿させた。DNA は, 80%エタノール 300 μ l にて洗浄した後, 減圧乾燥し, 試料溶解液 (0.06%ブROMフェノールブルー, 0.06%キシレンシアノールおよび6.7%グリセロールを含む TE 緩衝液) 9 μ l に溶解した。各試料は 0.5 μ g/ml エチジウムブロマイドを含む泳動緩衝液 (40mM Tris, 20mM 酢酸ナトリウム, 1mM EDTA, pH7.2) 中, 定電圧 100V において1.5%アガロースゲルで電気泳動を行った。泳動後サザン法¹⁵⁾に準じてトランスファーを行なった。即ち, 泳動終了後のゲルをアルカリ変性液 (0.5M 水酸化ナトリウム, 1.5M 塩化ナトリウム) 中で30分間振盪し DNA を変性させた後, 中和液 (3M 塩化ナトリウム, 0.5M トリス-塩酸, pH7.2) 中で15分間振盪した。中和操作を 2 回繰り返した後, DNA は 20 \times 食塩・クエン酸ナトリウム溶液 (saline sodium citrate, SSC) (3M 塩化ナトリウム, 0.3M クエン酸ナトリウム) を用いてナイロンメンブレンフィルター (Hybond-N, Amersham) にトランスファーした。ナイロンメンブレンフィルターに10分間紫外線を照射して, DNA をフィルターに固定した。フィルターはハイブリダイゼーション緩衝液 [6 \times SSC, Denhardt 液¹⁶⁾ (0.1%ポリビニルピロリドン, 0.1%ウシ血清アルブミン, 0.1%フィコール400), 10% 硫酸デキストラン, 0.1% SDS, および 0.1mg/ml サケ精子 DNA] 中, 43℃の恒温水槽において1時間のプレハイブリダイゼーションを行った。その後, 0.05% (V/V) ³²P 標識プローブを加え, 43℃において16時間のハイブリダイゼーションを行なった。フィルターは 2 \times SSC および 0.1% SDS を含む溶液中で 45℃, 15分の洗浄を 2 回行ない, 引き続き 0.1 \times SSC および 0.1% SDS を含む溶液中で 45℃, 1時間の洗浄を行なった。洗浄後 X 線フィルム (Kodak, New York, USA) を用いて室温下 12~18時間の感光を行なったオートラジオグラフィーで解析を行ない, さらにパイオイメージアナライザー (富士フィルム, 東京) により放射活性の測定を行なった。

IX. 抗腫瘍効果の評価と判定法

転移巣治療実験における効果判定は非治療群の PCR 産物を 100%とした場合の PCR 産物減少率を比較することによって行なった。治療効果 (腫瘍増殖抑制率, %) は次式により求めた。

$$\text{治療効果 (\%)} = (1 - T/C) \times 100$$

ただし T は治療群の放射活性, C は非治療群の放射活性とした。得られた結果は Student の t 検定により統計学的処理を行ない, 危険率が 5%以下である場合を有意とした。

X. 試験管内抗がん剤感受性試験

試験管内抗がん剤感受性試験には, Carmichael ら¹⁷⁾の方法に従い, 生細胞内の脱水素酵素の還元能を指標とするジメチルチアゾールジフェニールテトラゾリウムブロマイド [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 法を用いた。即ち, 各細胞株において 180 μ l の培養液中に細胞が 2 \times 10⁵ 個になるように細胞浮遊液を作製し, これを 96穴平底マイクロウエルプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) に 1 ウェル当たり 180 μ l 分注した。同時に各種抗がん剤を 20 μ l 加え, CO₂ 濃度 5%, 37℃の条件下で 3日間培養した。なお CPM は試験管内では不活性であるため, 活性型の 4-ヒドロペロキ

サイクロフォスファミド (hydroperoxycyclophosphamide, 4OH-CPM) (塩野義製薬) を用いた。PBS に溶解した 2mg/ml 濃度の MTT 試薬 (Sigma) を 1 ウェル当たり 25 μ l 加え、さらに 4 時間培養した。培養後培地を吸引し、ジメチルスルフォキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO) (Sigma) 200 μ l を加え、生成した MTT ホルマゼン結晶を溶解した。マイクロプレートミキサー MPM-1 (岩城硝子, 東京) にて均等に拡散させ、各ウェルの 540nm における吸光度をイムノリーダー (日本インターメッド, 東京) を用いて測定した。効果判定 (増殖抑制率) は、対照群の吸光度を 100% とし、薬剤投与群の吸光度を比較することにより求めた。増殖抑制率の算出方法を次式に示す。

$$\text{増殖抑制率 (\%)} = (1 - T/C) \times 100$$

ただし T は薬剤投与群の吸光度、C は対照群の吸光度とした。

XI. 鶏卵胎児肝および肺の転移巣より分離した腫瘍細胞に対する試験管内抗がん剤感受性試験

孵卵 10 日目の受精鶏卵の漿尿膜の血管内に腫瘍細胞を 1×10^6 個移植し、孵卵 17 日目の胎児より肝及び肺を摘出した。各臓器を鉋で細切し、組織培養液で 5 回洗浄後、単層培養系で

転移している腫瘍細胞を増殖させた。その後、腫瘍細胞の抗がん剤に対する薬剤感受性を MTT 法により検討した。

XII. 腫瘍細胞移植後の鶏卵胎児肝の組織学的検索

1×10^6 個の MNNG/HOS 細胞を孵卵 10 日目の受精鶏卵の漿尿膜上の血管内に移植し、移植 3 日目に抗がん剤を投与した。移植 7 日後、胎児を解体し肝を摘出した。胎児肝は 10% でホルマリン液中で浸漬固定後ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosine, H. E.) 染色を行い、転移巣形成の有無を抗がん剤非投与の胎児肝と比較検討した。また MNNG/HOS 細胞移植後経時的に胎児肝を摘出し、H. E. 染色標本を作成し肝転移形成過程を組織学的に観察した。

成 績

I. 受精鶏卵胎児におけるヒト骨軟部悪性腫瘍細胞の転移能

ヒト線維肉腫細胞 HT-1080 と 6 種の骨肉腫細胞 MNNG/HOS, KHOS-312H, U-2OS, OST, MG-63 および SK-ES-1 の鶏卵胎児臓器における転移能を検討した。孵卵 10 日目の受精鶏卵漿尿膜上の血管内に各腫瘍細胞 (1×10^6 個) を移植した。移植後 7 日目に鶏卵胎児より摘出した肺および肝の DNA 試料についてプライマー、Hu β -1 および Hu β -8 を用いて PCR によるヒト β -グロビン遺伝子配列 576 塩基対の増幅を行った。サザンブロットハイブリダイゼーション法により増幅 DNA 断片を解析した結果、HT-1080, MNNG/HOS および SK-ES-1 を移植した

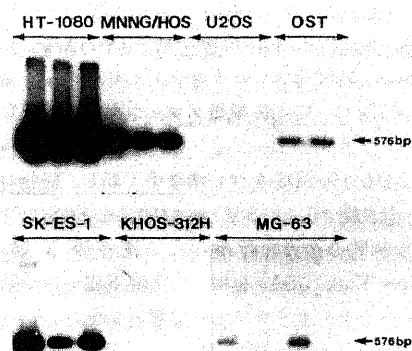


Fig. 2. Detection of experimental liver metastasis following intravenous inoculation of human bone and soft tissue tumor cell lines, HT-1080, MNNG/HOS, U-2OS, OST, SK-ES-1, KHOS-312H and MG-63. Cells were injected into the CAM vein. Embryos were received each cell line at the inoculum size of 1×10^6 cells and incubated for 7 days. Then their livers were dissected out and weighed, and the DNA was extracted. DNA samples were amplified by 26 cycles of PCR and hybridized to the probe Hu β -2 as described in "Materials and Methods." DNA from chick embryos having metastatic tumor cells produced a single band of the expected size (576 bp) for the human β -globin gene. Results of each lane indicate the individual differences of used embryos, respectively.

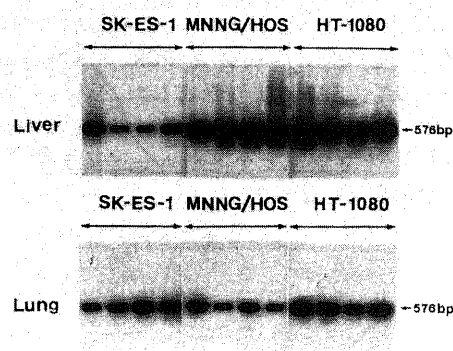


Fig. 3. Detection of experimental liver and lung metastasis following intravenous inoculation of SK-ES-1, MNNG/HOS and HT-1080 cells. Embryos received one of SK-ES-1, MNNG/HOS, and HT-1080 cells (10^6 cells). Four embryos from each group were killed at 7 days after cell inoculation. Embryo livers and lungs were dissected out and weighed, and the DNA was extracted. 1 μ g of DNA was tested by PCR and Southern blot analysis as described in "Materials and Methods." DNA from each embryos received tumor cell inoculation produced the PCR fragments (576 bp).

Table 2. Comparison of metastatic ability of human tumor cell lines in chick embryonic organs

Tumor cells	Tissue weight (mean \pm SD, mg)		Radioactivity ^a {(AU ^b \pm SD)/1 mg of tissue}		Ratio of radioactivity (liver/lung)
	Liver	Lung	Liver	Lung	
HT-1080	457.0 \pm 7.3	153.9 \pm 39.3	1929.9 \pm 272.1	591.9 \pm 260.9	3.26
MNNG/HOS	495.1 \pm 104.2	148.0 \pm 9.8	1975.5 \pm 246.2	204.0 \pm 124.4	9.68
SK-ES-1	381.9 \pm 36.4	129.7 \pm 34.7	632.0 \pm 426.4	576.7 \pm 272.5	1.10

a) Radioactivity of ³²P-labelled probe hybridized with PCR products.

b) Arbitrary unit.

鶏卵胎児肝の DNA において転移細胞の存在を示す576塩基対の増幅 DNA 断片が検出された。また OST, MG-63 を移植した胎児肝 DNA においてもヒト β -グロビン遺伝子配列が検出されたが、PCR 産物量は HT-1080, MNNG/HOS および SK-ES-1 に比較し少ないものであった。一方、U-2OS, KHOS-312H を移植した鶏卵胎児肝 DNA では PCR 産物はまったく検出されなかった (図2)。各臓器の DNA より検出された PCR 産物量を相補結合したプローブ DNA の放射活性と比較した場合、HT-1080 および MNNG/HOS を移植した胎児肝の DNA においては単位組織重量当りの平均放射活性が肺 DNA に比較し大幅に上まわっていた。これに対して SK-ES-1 では肝および肺 DNA より検出された単位組織重量当りの PCR 産物量はほぼ同程度の値を示した (表2, 図3)。即ち単位組織重量当りの転移巣は肺に比べ肝の方が HT-1080 で約3倍、MNNG/HOS では約10倍多く、これらの腫瘍細胞は鶏卵胎児において肝転移形成能が高いことが明らかになった。一方、SK-ES-1 は肝と肺における転移巣形成はほぼ同程度で HT-1080 や MNNG/HOS に比べ肺への転移指向性が高いことが示唆された。また腫瘍移植7日後の鶏卵胎児肝および肺における転移巣の組織学的検索の結果、これら3株の腫瘍細胞に転移細胞が多数観察され PCR 法による検出結果と一致していた。

II. ヒト骨軟部悪性腫瘍の転移巣に対する抗がん剤感受性試験

受精鶏卵法による転移実験で高い転移能を示した HT-1080, MNNG/HOS および SK-ES-1 の転移巣に対する抗がん剤感受性試験を施行した。抗がん剤は腫瘍細胞移植後3日目に受精鶏卵漿尿膜上の血管内より投与し、抗がん剤投与後4日目即ち腫瘍移植後7日目に肺および肝を摘出した。各臓器の DNA 試料に対して PCR を行い、サザンブロットハイブリダイゼーション法により増幅 DNA 断片を解析した。HT-1080 細胞を移植した胎児に抗がん剤 ADM (40 μ g/卵), CPM (500 μ g/卵), VLB (1 μ g/卵) および MMC (20 μ g/卵) を投与した結果、抗がん剤を投与した胎児肝の DNA においては、抗がん剤非投与の胎児肝 DNA に比較し検出された PCR 産物量は明らかに減少していた。抗がん剤投与群における転移抑制率は各々 ADM: 89.5%, CPM: 76.3%, VLB: 86.6%, MMC: 83.4%であった。一方、

CDDP (10, 5 μ g/卵) および CPM (250 μ g/卵) の投与は HT-1080 の肝転移巣に対する治療効果を示さず、それらの転移抑制率は各々-0.2%, 5.3%および4.6%にとどまった (表3, 図4)。MNNG/HOS 細胞の肝転移巣は MMC (20 μ g/卵) および ADM (40 μ g/卵) に対して高い感受性を示した (転移抑制率: MMC, 85.0%; ADM, 72.9%)。しかし、CPM (100 μ g/卵), VP-16 (40 μ g/卵) および VLB (1 μ g/卵) では治療効果が見られなかった (表4, 図5)。SK-ES-1 細胞の肝転移巣は各抗がん剤に対して比較的高い感受性を示した (表5, 図6)。さらに、いずれの腫瘍細胞においても肺転移巣に対する治療効果と

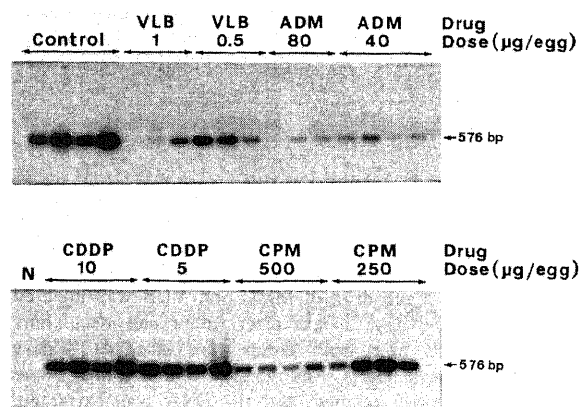


Fig. 4. Effect of antitumor drugs on liver metastasis of HT-1080 cells in chick embryo. HT-1080 cells (10^6 cells) were injected into the CAM vein of 10-day chick embryo. Antitumor drugs were intravenously injected 3 days after tumor cell inoculation. Eight groups of embryos injected tumor cells received each drug at the indicated dose. Three or four embryos from each group were killed at 7 days after cell inoculation. Embryo livers were dissected out and weighed, and the DNA was extracted. 1 μ g of DNA was tested by PCR and Southern blot analysis as described in "Materials and Methods." "N" indicates 1 μ g of DNA from chick embryonic liver as negative control for PCR. PCR products of predicted size (576 bp) were generated using specific primers for the human β -globin gene.

Table 3. Effect of antitumor drugs on liver metastasis of HT-1080 cells in embryonic chick

Drug	Dose (μ g/egg)	Radioactivity (AU ^a \pm SD)	IR ^b (%)
ADM	80	13.7 \pm 9.4	93.8 ^{c)}
	40	23.0 \pm 13.2	89.5 ^{c)}
CDDP	10	216.7 \pm 60.0	-0.2
	5	207.6 \pm 46.0	5.3
CPM	500	52.0 \pm 18.9	76.3 ^{c)}
	250	209.6 \pm 137.5	4.6
VLB	1	29.3 \pm 31.5	86.6 ^{c)}
	0.5	98.4 \pm 50.0	55.1 ^{d)}
Control		219.2 \pm 128.2	
MMC	20	184.6 \pm 75.4	83.4 ^{d)}
Control		1111.6 \pm 439.8	

a) Arbitrary unit.

b) Inhibition ratio = {1 - (AU of treated group) / (AU of control group)} \times 100

c) P < 0.001 d) P < 0.01 e) P < 0.05

肝転移巣の治療効果はほぼ一致していた。

Ⅲ. MNNG/HOS 細胞を移植した鶏卵胎児肝の抗がん剤投与後の組織学的所見

MNNG/HOS 細胞移植 3 日後に抗がん剤を投与した胎児肝のホルマリン固定標本の H. E. 染色像を図 7 に示した。腫瘍移

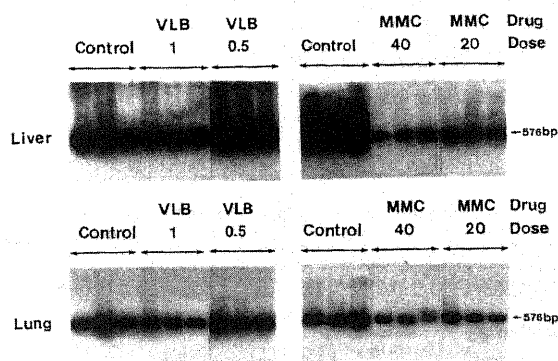


Fig. 5. Effect of antitumor drugs on liver and lung metastasis of MNNG/HOS cells in chick embryo. MNNG/HOS cells (10^6 cells) were injected into the CAM vein of 10-day chick embryo. Each drug of MMC and VLB was injected at the indicated dose 3 days after tumor cell inoculation. Three embryos from each group were killed at 7 days after cell inoculation. Embryo livers and lungs were dissected out and weighed, and the DNA was extracted. $1\mu\text{g}$ of DNA was tested by PCR and Southern blot analysis as described in "Materials and Methods."

植後 7 日目の抗がん剤非投与の鶏卵胎児肝および VLB ($1\mu\text{g}/\text{卵}$) 投与群の胎児肝では多数の MNNG/HOS 細胞が転移巣を形成していることが認められた。一方, MMC ($40\mu\text{g}/\text{卵}$) を投与した胎児肝においても少数の転移細胞が観察されたが, 抗がん剤非投与の胎児肝に比較し転移細胞は明らかに減少していた。これらの結果は PCR による検出法の結果と一致していた。

Ⅳ. MNNG/HOS 細胞を移植した鶏卵胎児肝の経時的な組織学的所見

MNNG/HOS 細胞を鶏卵漿尿膜上の血管内に 1×10^6 個移植した後, 経時的に摘出した胎児肝の H. E. 染色標本を作製し, 肝転移形成過程を組織学的に観察した。その結果, 血管内に移植した腫瘍細胞は 2 時間後および 8 時間後では微小血管内に存在していたが, 12 時間後には腫瘍細胞は血管内皮細胞内に侵入していた。さらに, 22 時間および 51 時間後では分裂増殖が認められ, 7 日後では転移巣を多数形成していた (図 8)。

Ⅴ. 転移初期における抗がん剤投与の効果

血管内に移植した MNNG/HOS 細胞は移植後 2 ~ 8 時間においては微小血管内に存在すること, また脈管外に浸出した腫瘍細胞は移植 22 時間以内より分裂増殖することが本研究で明らかとなった。そこで, 転移巣の形成阻止を意図した抗がん剤による早期治療モデルとしての本法の有用性を検討するため, 転移初期段階に投与した抗がん剤の転移抑制効果について試験した。孵卵 10 日目の受精鶏卵漿尿膜上の血管内に腫瘍細胞を移植した後, 2 時間, 24 時間および 72 時間に MMC または VLB を投与し, 腫瘍移植後 7 日目の胎児肝における転移腫瘍細胞を PCR を用いた検出法により解析した。なお薬剤は臨床投与量

Table 4. Effect of antitumor drugs on liver and lung metastasis of MNNG/HOS cells in embryonic chick

Drug	Dose ($\mu\text{g}/\text{egg}$)	Liver		Lung	
		Radioactivity (AU ^a \pm SD)	IR ^b (%)	Radioactivity (AU \pm SD)	IR (%)
CDDP	20	19.6 \pm 17.5	78.1 ^{d)}	42.0 \pm 14.4	64.9 ^{d)}
	10	56.0 \pm 8.5	37.4 ^{e)}	77.0 \pm 28.9	35.7 ^{e)}
	5	62.9 \pm 20.3	29.6 ^{e)}	99.7 \pm 12.8	16.7
ADM	40	24.2 \pm 16.4	72.9 ^{e)}	66.4 \pm 6.3	44.5 ^{e)}
	20	65.1 \pm 37.9	27.2 ^{e)}	111.8 \pm 30.8	6.6
	10	82.0 \pm 23.3	8.3	80.0 \pm 18.7	33.2 ^{e)}
Control		89.4 \pm 27.8		119.7 \pm 29.3	
CPM	250	339.2 \pm 89.6	41.8	69.7 \pm 50.7	48.4
	100	484.4 \pm 90.5	16.8	68.5 \pm 18.7	49.3 ^{d)}
Control		582.5 \pm 234.9		135.2 \pm 34.4	
VP-16	40	729.1 \pm 173.1	8.9	647.0 \pm 215.7	24.7
	20	911.9 \pm 156.0	-13.9	927.6 \pm 143.5	-8.0
Control		800.3 \pm 176.5		859.0 \pm 58.2	
MMC	40	111.6 \pm 19.6	91.6 ^{e)}	49.7 \pm 8.9	78.3
	20	199.7 \pm 65.1	85.0 ^{e)}	84.9 \pm 39.3	63.0
Control		1333.7 \pm 102.7		229.3 \pm 134.5	
VLB	1	991.9 \pm 252.0	28.6	188.5 \pm 87.9	21.4
	0.5	1489.3 \pm 255.1	-7.2	259.0 \pm 121.6	-8.0
Control		1388.7 \pm 378.7		239.9 \pm 82.5	

a) Arbitrary unit.

b) Inhibition ratio = $\{1 - (\text{AU of treated group}) / (\text{AU of control group})\} \times 100$

c) $P < 0.001$ d) $P < 0.01$ e) $P < 0.05$

を基に鶏卵胎児の平均体重から算出した有効量を投与した。MNNG/HOS 細胞の移植 2 時間後に MMC (8 μ g/卵) を投与した鶏卵胎児においては薬剤非投与の胎児に比較し顕著に肝転移腫瘍細胞の減少が見られ、その転移抑制率は 91.9% であった。また、移植後 24 時間の MMC (10 μ g/卵) の投与では 83.2%, 72 時間後の MMC (20 μ g/卵) の投与では 51.8% の抑制率を示した。一方、VLB 投与群の転移抑制率は移植後 2 時間の投与で -2.2%, 72 時間後の投与では 10.4% であり、抑制効果は見ら

れなかった (表 6, 図 9)。さらに、HT-1080 細胞の転移巣に対して高い治療効果を示す VLB と ADM を投与した結果でも、同様に腫瘍移植後、より早期に投与した方が高い転移抑制率が得られた (表 7)。

VI. 鶏卵胎児肝および肺の転移巣より分離した腫瘍細胞に対する試験管内抗がん剤感受性試験

鶏卵胎児肝および肺の転移巣より分離した MNNG/HOS 細胞の抗がん剤に対する試験管内の感受性を MTT 法を用いて調べた。転移巣治療実験に用いた 6 種の抗がん剤を用い、抗がん剤の各細胞に対する増殖抑制率を算出した結果、継代細胞の IC₅₀ (μ g/ml) は CDDP: 0.48, ADM: 0.09, CPM: 1.1, VP-16: 1.7, MMC: 0.18 および VLB: 0.002 であった。一方、肝転移細胞の各抗がん剤に対する IC₅₀ (μ g/ml) は、CDDP: 0.32, ADM: 0.048, CPM: 0.75, VP-16: 0.56, MMC: 0.12 および VLB: 0.002 であり、肺転移細胞の各抗がん剤に対する IC₅₀ (μ g/ml) は CDDP: 0.52, ADM: 0.048, CPM: 0.64, VP-16: 0.70, MMC: 0.23 および VLB: 0.002 であった。継代細胞と肝、肺転移細胞の IC₅₀ 値はほぼ同程度の値を示し、感受性に違いが見られなかった。

考 察

従来、ヒトがんの転移実験は主に株化細胞を用いた試験管内の実験であり、転移過程の各段階を人工的に再現することにより行われてきた。ヒトがんに対する異種移植の宿主動物として Povlsen ら¹⁸⁾ が初めてヒト腫瘍組織の移植に成功して以来、先天的に胸腺を欠失したヌードマウスが使用されてきた。しかし、ヌードマウス法はヒト腫瘍の生着率が低いことに加え、ヒト腫瘍の自然転移率も極めて低いとされてきた^{19)~21)}。1980年代の後半、Ewing²²⁾ の“解剖学的非無作為転移 (anatomical-

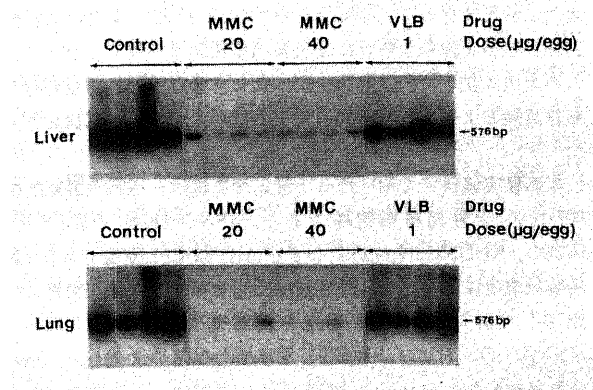


Fig. 6. Effect of antitumor drugs on liver and lung metastasis of SK-ES-1 cells in chick embryo. SK-ES-1 cells (10⁶ cells) were injected into the CAM vein of 10-day chick embryo. Each drug of MMC and VLB was injected at the indicated dose 3 days after tumor cell inoculation. Four embryos from each group were killed at 7 days after cell inoculation. Embryo livers and lungs were dissected out and weighed, and the DNA was extracted. 1 μ g of DNA was tested by PCR and Southern blot analysis as described in "Materials and Methods."

Table 5. Effect of antitumor drugs on liver and lung metastasis of SK-ES-1 in embryonic chick

Drug	Dose (μ g/egg)	Liver		Lung	
		Radioactivity (AU ^a \pm SD)	IR ^b (%)	Radioactivity (AU \pm SD)	IR (%)
ADM	40	8.1 \pm 2.0	94.7 ^{c)}	19.2 \pm 10.8	96.3 ^{d)}
Control		154.2 \pm 90.4		514.8 \pm 224.0	
CDDP	20	9.3 \pm 3.8	97.6 ^{c)}	14.2 \pm 7.4	97.6 ^{c)}
	10	10.2 \pm 3.3	97.4 ^{d)}	43.0 \pm 25.6	92.6 ^{c)}
	5	12.0 \pm 5.2	91.7 ^{d)}	52.8 \pm 45.7	90.9 ^{c)}
Control		388.1 \pm 214.4		582.2 \pm 128.5	
CDDP	20	14.7 \pm 3.8	97.8 ^{c)}	16.0 \pm 3.3	96.1 ^{c)}
	10	80.7 \pm 93.1	87.9 ^{c)}	59.2 \pm 17.4	85.5 ^{c)}
ADM	40	45.5 \pm 22.7	93.2 ^{d)}	27.3 \pm 6.7	93.3 ^{c)}
CPM	250	24.7 \pm 20.8	96.3 ^{c)}	58.9 \pm 17.9	85.5 ^{c)}
	100	230.6 \pm 177.4	65.5 ^{c)}	257.5 \pm 64.8	36.8
Control		668.1 \pm 382.4		407.6 \pm 6.2	
VLB	1	120.8 \pm 67.4	52.4 ^{c)}	198.9 \pm 84.5	29.7
MMC	40	7.8 \pm 2.6	96.9 ^{c)}	2.9 \pm 2.7	99.0 ^{c)}
	20	10.4 \pm 7.7	95.9 ^{c)}	4.9 \pm 6.0	98.3 ^{c)}
Control		253.9 \pm 49.9		282.8 \pm 127.7	

a) Arbitrary unit.

b) Inhibition ratio = {1 - (AU of treated group) / (AU of control group)} \times 100

c) P < 0.001 d) P < 0.01 e) P < 0.05

mechanical)” 仮説および Paget²³⁾ の “土壌 (seed and soil)” 仮説を踏襲した “正常部位 (orthotopic)” 移植法を取り入れた移植経路を種々検討することにより、がんによっては高率に転移することが明らかにされ、ヌードマウス法が再認識されつつあるが^{24)~26)}、未だ確立された実験系とは言えない。特に骨軟部悪性腫瘍においては、HI-1080 細胞²⁶⁾や RD 細胞³⁰⁾を用いた転移実験が報告されているに過ぎない。

一方、受精鶏卵は Murphy³¹⁾ が鶏卵漿尿膜上に移植した腫瘍組織が生着し増殖することを報告したのを始めとして、実験動物腫瘍およびヒト腫瘍の移植のために使用されてきた^{32)~36)}。しかし、受精鶏卵を用いた腫瘍移植実験は増殖や転移など腫瘍の生物学的特性について研究したものが多く、ヒト腫瘍の治療実

験に関する報告は少なかった^{37)~40)}。佐々木らは受精鶏卵を動物腫瘍あるいはヒト腫瘍に対する宿主動物として用い、移植腫瘍に対する抗がん剤感受性試験、転移巣治療実験および腫瘍の悪性度判定試験が可能であることを系統的な研究により証明した^{41)~43)}。しかし、受精鶏卵を転移実験に用いる場合、実験可能期間が7日間と短いため形成される転移巣は極く微小で、転移巣の検出は病理組織学的検索によっても困難であり、定量性に問題があった。この問題を解決するため同グループは、ヒトβ-グロブリン遺伝子576塩基対に対する特異的なプライマーを用いた PCR 法⁴⁴⁾により、鶏卵胎児臓器中のヒト腫瘍転移細胞を定量的に検出できることを報告した^{44)~45)}。本研究では骨軟部悪性腫瘍の転移実験系ならびに転移巣治療実験系の確立を目指し、この方法に従い、受精鶏卵を用いたヒト骨軟部悪性腫瘍細胞の転移実験および微小転移巣に対する抗がん剤感受性試験を行った。

本転移実験研究で用いたヒト腫瘍細胞株は、線維肉腫細胞株 HT-1080 と骨肉腫細胞株である MNNG/HOS, SK-ES-1, U-2OS, KHOS312H, OST および MG-63 の7種類である。受精鶏卵漿尿膜上の血管内に各腫瘍細胞を移植し、鶏卵胎児より摘出した肝における転移能を検討した結果、HT-1080, MNNG/HOS および SK-ES-1 を移植した鶏卵胎児肝の DNA に転移細胞の存在を示す PCR 法による増幅 DNA 断片が検出された。さらに、腫瘍移植7日後の鶏卵胎児肝および肺における転移細胞の組織学的検索の結果、HT-1080, MNNG/HOS および SK-ES-1 の転移細胞が多数観察され、PCR 法による検出結果と一致していた。以上の結果は HT-1080, MNNG/HOS および SK-ES-1 が受精鶏卵において高い転移能を示し、また PCR 法を用いることによって鶏卵胎児におけるヒト腫瘍転移細胞を定量的、かつ特異的に検出できることを示している。

マトリックスメタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) ファミリーの発現と転移能は強く相関することが示唆されており^{46)~48)}、HT-1080, MNNG/HOS および SK-ES-1 にはいずれも MMP-2 (72kDa ゼラチナーゼ/N型コラゲナーゼ) と MMP-9 (92kDa ゼラチナーゼ/N型コラゲナーゼ) が発現していることが報告されている⁴⁹⁾。本研究で、この3種の細胞が特に高い転移能を示したことは、MMPs 発現が受精鶏卵における転移に重要な役割を果たしていることを示唆している。また、各臓器の DNA より検出された PCR 産物量を単位組織重量当りの平均放射活性で比較した結果、HT-1080 と MNNG/HOS を移植した場合、肺より肝のほうが約3~10倍転移細胞が多いことが明らかになった。一方、SK-ES-1 では、肝転移と肺転移はほぼ同程度であった。腫瘍細胞を移植する卵期10日目の鶏卵胎児の肺組織は未成熟であり、循環系の発達は肝に比べ乏しい。従って、血管内移植した腫瘍細胞は肺よりも肝に多く転移する傾向がある。今回の実験でも HT-1080 や MNNG/HOS の肝転移が肺転移より多く認められたが、SK-ES-1 は肺へ転移指向性が他の腫瘍細胞に比べ高いことが示唆された。このことは転移様式を決定する要因の一つとして Paget²³⁾ が提唱した土壌仮説を実証するものと考えられる。また受精鶏卵法は他の実験動物と同様に転移に係わる生物現象を再現し得る生体内 (in vivo) の実験系として十分な有用性を備えていることを示している。

転移巣に対する抗がん剤感受性試験として移植後3日目に抗がん剤を血管内に投与した場合、HT-1080, MNNG/HOS およ

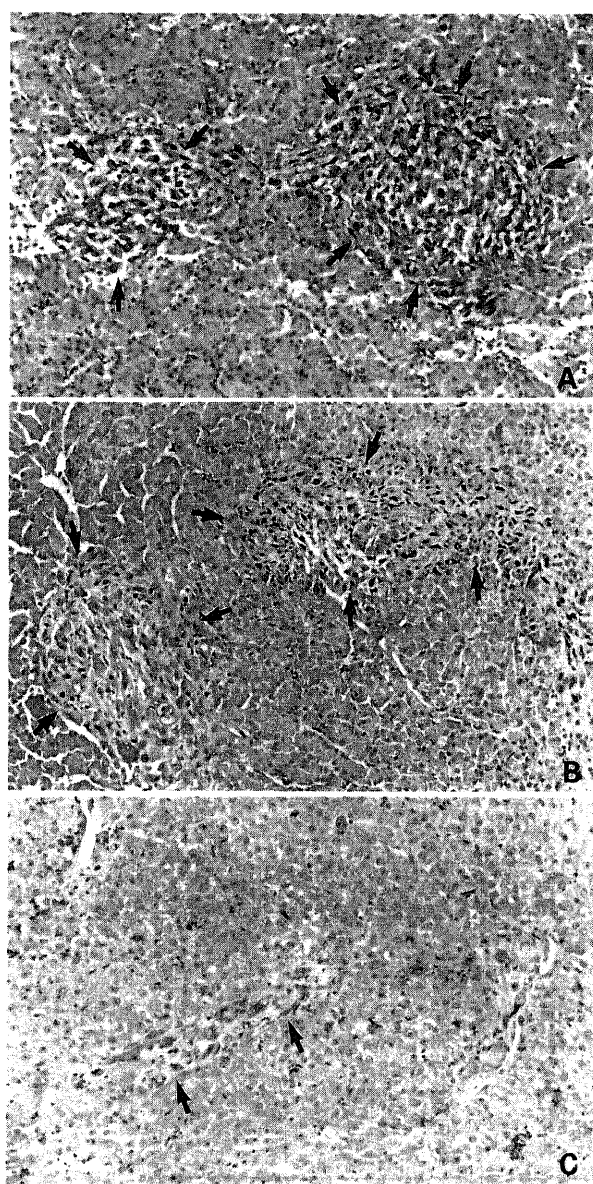


Fig. 7. Histological sections of embryonic chick liver 7 days after inoculation of MNNG/HOS cells. In chick embryonic livers untreated (A) and treated (B) with VLB (1 µg/egg), large metastatic foci were formed 7 days after cell inoculation. On the other hand, small metastatic foci were formed in embryos treated with MMC (40 µg/egg) (C). Arrows indicate metastatic cells. H. E. stain, ×50.

び SK-ES-1 の転移巣は抗がん剤により異なる感受性を示したが、肝転移巣と肺転移巣に対する抗がん剤の治療効果はいずれの腫瘍細胞においてもほぼ一致していた。また鶏卵胎児肝および肺の転移巣より分離した腫瘍細胞に対する MTT を用いた抗がん剤感受性試験でも、継代細胞と肝転移巣と肺転移巣における抗がん剤の感受性に違いは認められなかった。従ってこれらの細胞の転移巣における薬剤感受性は、個々の細胞の抗がん剤に対する反応性を反映したものであり、転移過程において薬剤感受性の異なる細胞が選択されていないことを示している。即ち、培養細胞においては薬剤感受性や転移能を含めた細胞母集団の多様性が低いために、原発巣（培養細胞）と転移巣では同様の抗がん剤感受性を示すものと考ええる。臨床的には腫瘍が同一組織像、同一個体のものでも、原発巣と再発巣あるいは転移巣の違いによって、抗がん剤の感受性が異なることは多くの報告によって明らかである^{50,51)}。従って、培養細胞に比べより多様性の高い臨床腫瘍を転移実験に用いて転移巣における治療効果を調べた場合、原発巣と転移巣で異なる感受性を示すことが十分考えられる。受精鶏卵法は臨床腫瘍の生着率が高いことから、転移能の推測のみならず、転移腫瘍の薬剤感受性を予測す

る実験系として有用であると考ええる。

腫瘍細胞を移植した鶏卵胎児肝の組織学的所見を経時的に検討した結果、腫瘍細胞は移植 2 時間、8 時間後では微小血管内に存在するが、12 時間後では血管内皮細胞内に侵入し、さらに 22 時間および 51 時間後には分裂増殖を開始していることが明らかになった。この所見は、受精鶏卵漿尿膜の血管内に移植した腫瘍細胞は移植後 2 時間では微小血管内に存在するが移植後 8 時間以内にほとんどの細胞は血管外に浸出するという Chambers ら⁵²⁾ がビデオマイクロスコープを用いて行なった実験結果と一致した。

上述の試験結果を基に、転移の初期段階に抗がん剤を投与した場合の転移抑制効果について検討を行った。MNNG/HOS 細胞の転移巣に対して MMC あるいは VLB を腫瘍移植 2 時間後、1 日または 3 日後に投与した結果、転移抑制率は MMC 投与群では各々 91.9%、83.2% および 51.8% であり、VLB 投与群では 2 時間後の投与で -2.2%、3 日後の投与では 10.4% であった。これらの結果は、移植後早期に有効な薬剤を投与することが腫瘍細胞の転移抑制に最も効果的であることを示している。

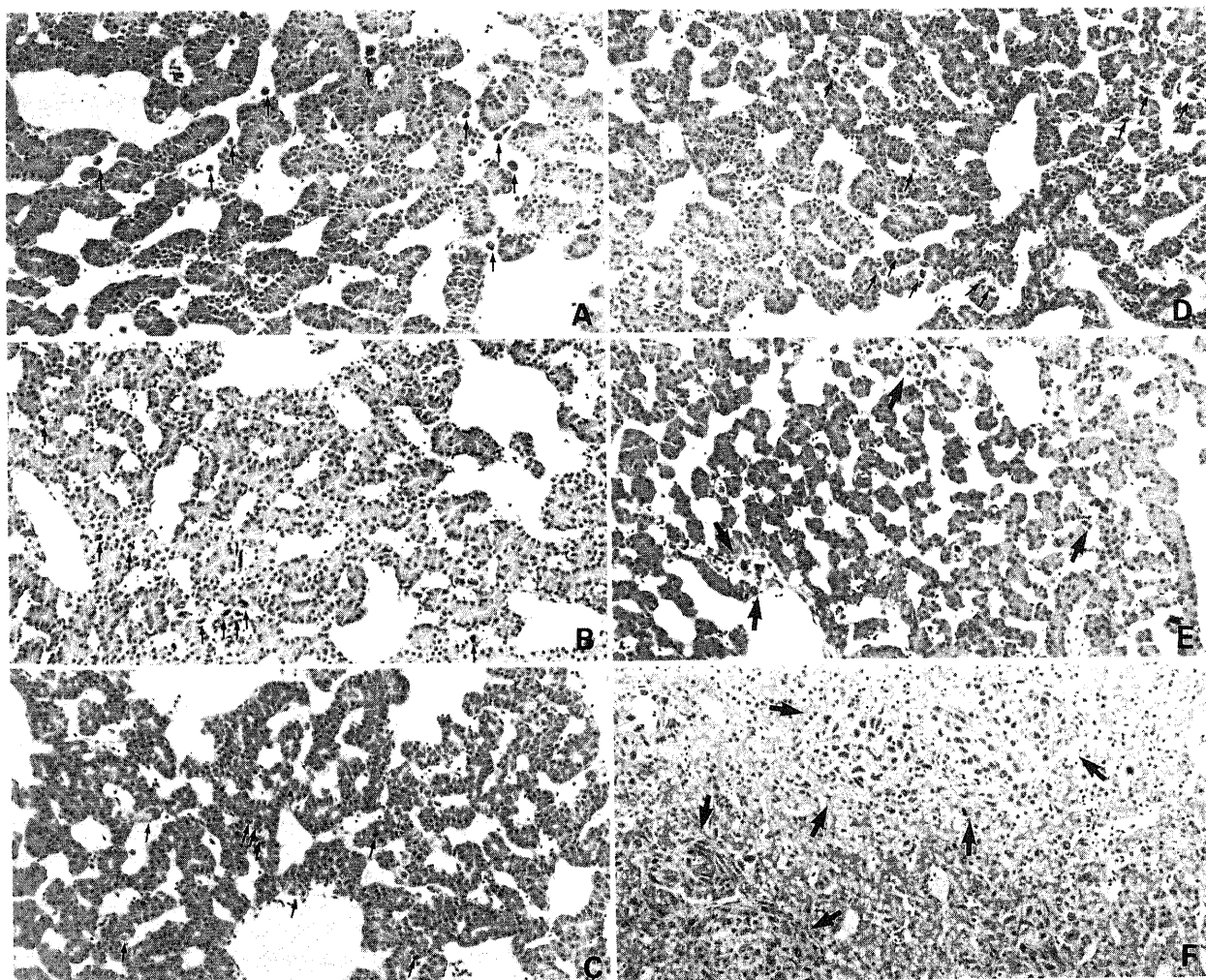


Fig. 8. Histological sections of embryonic chick liver after i. v. inoculation of MNNG/HOS cells. At 2 hrs (A) and 8 hrs (B), tumor cells existed in small vessels. At 12 hrs (C), tumor cells invaded into the endothelial cells. At 22 hrs (D) and 51 hrs (E), tumor cells showed mitosis and proliferation. Tumor cells formed metastatic foci on day 7 (F). Arrows indicate metastatic cells. H. E. stain, $\times 50$.

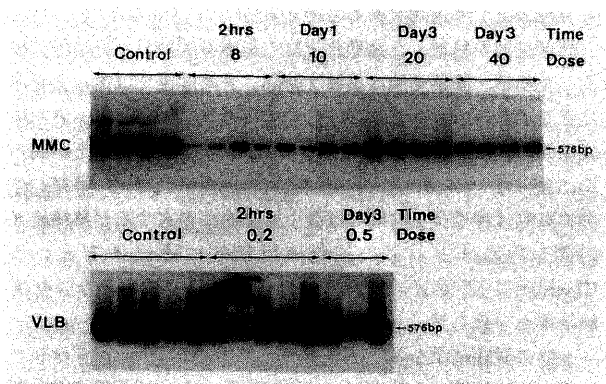


Fig. 9. Effect of antitumor drugs on liver metastasis of MNNG/HOS cells in chick embryo. MNNG/HOS cells (10^6 cells) were injected into the CAM vein of 10-day chick embryo. Injection of MMC and VLB were performed either 2 hrs, day 1 or day 3 after tumor cell inoculation. Embryos from each group were killed at 7 days after cell inoculation. Embryo livers were dissected out and weighed, and the DNA was extracted. 1 μ g of DNA was tested by PCR and Southern blot analysis as described in "Material and Methods."

Table 6. Comparison of inhibitory effect of antitumor drugs administered at a different time on metastasized MNNG/HOS cells in embryonic chick organs

Drug	Time ^{a)}	Dose (μ g/egg)	Liver		Lung	
			Radioactivity (AU ^{b)} \pm SD)	IR ^{c)} (%)	Radioactivity (AU \pm SD)	IR (%)
MMC	2hrs	8	135.0 \pm 132.6	91.9 ^{d)}	40.8 \pm 31.5	89.0 ^{e)}
	Day1	10	279.8 \pm 183.7	83.2 ^{d)}	98.9 \pm 57.8	73.3 ^{e)}
	Day3	20	800.5 \pm 311.5	51.8 ^{d)}	177.1 \pm 36.6	52.1 ^{e)}
		40	455.5 \pm 154.8	72.6 ^{d)}	92.9 \pm 22.9	74.9 ^{d)}
Control			1660.8 \pm 157.4		370.1 \pm 178.5	
VLB	2hrs	0.2	896.4 \pm 301.3	-2.2	243.4 \pm 26.3	28.7
	Day3	0.5	785.9 \pm 351.8	10.4	336.7 \pm 122.8	1.4
Control			877.1 \pm 160.1		341.6 \pm 87.3	

a) Drugs were injected at the stated time after tumor cell inoculation.

b) Arbitrary unit.

c) Inhibition ratio = $\{1 - (\text{AU of treated group}) / (\text{AU of control group})\} \times 100$

d) $P < 0.001$ e) $P < 0.01$

Table 7. Comparison of inhibitory effect of antitumor drugs administered at a different time on metastasized HT-1080 cells in embryonic chick organs

Drug	Time ^{a)}	Dose (μ g/egg)	Liver		Lung	
			Radioactivity (AU ^{b)} \pm SD)	IR ^{c)} (%)	Radioactivity (AU \pm SD)	IR (%)
VLB	2hrs	0.2	790.3 \pm 399.9	48.1	601.2 \pm 262.0	58.5
	Day1	0.25	1091.8 \pm 401.3	28.3	658.4 \pm 263.5	54.5 ^{e)}
	Day3	0.5	257.2 \pm 70.2	83.1 ^{d)}	349.0 \pm 106.5	75.9 ^{d)}
ADM	2hrs	4	150.4 \pm 94.2	90.1 ^{d)}	256.1 \pm 118.8	82.3 ^{d)}
		8	16.8 \pm 10.9	98.9 ^{d)}	28.4 \pm 14.5	98.0 ^{d)}
	Day1	5	290.4 \pm 24.9	80.9 ^{d)}	512.1 \pm 303.4	64.6 ^{d)}
		10	119.1 \pm 65.7	92.2 ^{d)}	159.4 \pm 95.4	89.0 ^{d)}
	Day3	10	346.1 \pm 50.7	77.3 ^{d)}	339.4 \pm 76.8	76.6 ^{d)}
		20	335.1 \pm 88.0	78.0 ^{d)}	147.6 \pm 106.9	89.8 ^{d)}
Control			1522.6 \pm 381.0		1448.3 \pm 350.9	
MMC	Day1	10	96.2 \pm 47.3	88.2 ^{d)}	259.0 \pm 98.0	83.1 ^{e)}
	Day3	20	181.1 \pm 117.4	77.2 ^{d)}	315.5 \pm 156.6	79.5 ^{d)}
Control			813.0 \pm 177.2		1536.7 \pm 377.1	

a) Drugs were injected at the stated time after tumor cell inoculation.

b) Arbitrary unit.

c) Inhibition ratio = $\{1 - (\text{AU of treated group}) / (\text{AU of control group})\} \times 100$

d) $P < 0.001$ e) $P < 0.01$

受精鶏卵法に PCR およびサザンブロット法を用いた検出系を適応させることにより、ヒト骨軟部悪性腫瘍の転移実験および微小転移巣に対する抗癌剤感受性試験が可能であることを明らかにした。本研究ではヒト骨軟部悪性腫瘍の細胞株を用いて実験を行ったが、今後、臨床腫瘍を用いる転移実験系に本法を適用させることにより、転移がんの治療ならびに転移抑制法の開発に大きく貢献することが期待される。

結 論

受精鶏卵を用いた転移実験系により、ヒト骨軟部悪性腫瘍細胞の転移能を検定し、さらに高転移性細胞の転移巣に対する抗癌剤感受性試験を行なった。鶏卵胎児における転移細胞の検出法として、転移腫瘍に含まれるヒトに特異的な β -グロビン遺伝子配列を PCR 法により増幅した後、サザンブロット法にて増幅 DNA 断片を検出および解析し、以下の結果を得た。

1. 孵卵10日目の鶏卵漿尿膜上の血管内に移植した骨軟部悪性腫瘍培養株7株のうち、HT-1080, MNNG/HOS および SK-ES-1 の3株が鶏卵胎児において高い転移能を有していることが判明した。さらに、SK-ES-1 は HT-1080 や MNNG/HOS に比べ肝より肺への転移指向性が高いことが示唆された。

2. 高転移性骨軟部腫瘍細胞の転移巣に対する抗癌剤の感受性を検討した。腫瘍細胞移植後3日目に抗癌剤を漿尿膜上の血管内に投与した結果、HT-1080, MNNG/HOS および SK-ES-1 の転移巣ではいずれも ADM と MMC に高い感受性を示した。また CDDP, CPM および VLB に対する転移巣の感受性は細胞株により異なり、SK-ES-1 は CDDP および CPM に、HT-1080 は VLB に高感受性を示した。しかし、MNNG/HOS の転移巣は CDDP, CPM, VLB の同投与量において感受性を示さなかった。これらの結果は、MTT 法を用いた抗癌剤感受性試験の結果と一致していた。

3. MNNG/HOS 細胞を移植した胎児肝を経時的に調べた組織学的所見では、腫瘍細胞は2時間および8時間後では微小血管内に存在していたが、12時間後には血管内皮細胞内に侵入していた。さらに、22時間および51時間後では分裂増殖が認められ、7日後では転移巣を多数形成していることが確認された。

4. MNNG/HOS 細胞移植2時間後、1日または3日後に抗癌剤を投与した結果、MMC 投与群の肝転移巣抑制率は各々91.9%, 83.2%および51.8%であった。一方、VLB 投与群の肝転移巣抑制率は移植2時間後の投与で-2.2%, 3日後の投与で10.4%であった。腫瘍細胞移植後の早期に有効な抗癌剤を投与することにより、転移が抑制されることが示された。

5. 受精鶏卵法に PCR 法およびサザンブロット法を応用することにより、ヒト骨軟部悪性腫瘍の転移巣を高精度かつ定量的に検出できた。本法はヒト骨軟部悪性腫瘍の転移巣に対する抗癌剤感受性試験として十分な有用性を備えており、転移、浸潤機構の解明および転移巣に対する治療法の開発に有用な実験系になるものと考えられる。

謝 辞

稿を終えるに臨み、懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師富田勝郎教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を直接御指導、御教授頂きました金沢大学がん研究所化学療法部佐々木琢磨教授に衷心より謝意を表します。また、本研究遂行にあたり、終始御助言、御協力頂きました金沢大学がん研究所化学療法部遠藤良夫先生に心より感謝いたします。さらに、組織標本の作製、病理組織所見に際し御教示、御協力頂き

ました金沢大学医療短期大学部岡田保典助教授、金沢大学第一病理木村顕子先生に深謝いたします。多大なる御協力を賜りました金沢大学がん研究所化学療法部の皆様と金沢大学整形外科腫瘍班の先生方に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Stephen, W.: Surgery for pulmonary metastatic tumours of bone. In R. Coombs & G. Friedlaender (eds.), Bone Tumour Management, 1st ed., p239-246, Butterworths, London, 1987.
- 2) Cortes, E. P., Holland, J. F. & Glidewell, O.: Amputation and adriamycin in primary osteosarcoma: a 5-year report. Cancer Treat. Rep., 62, 271-277 (1978).
- 3) Jaffe, N., Frei, C. E., Traggis, D. & Bishop, Y.: Adjuvant methotrexate and citovorum-factor treatment of osteogenic sarcoma. N. Engl. J. Med., 291, 994-997 (1974).
- 4) Rosen, G., Marcove, R., Caparros, B., Nirenberg, A., Kosloff, C. & Huvo, A. G.: Primary osteogenic sarcoma the rationale for preoperative chemotherapy and delayed surgery. Cancer, 43, 2163-2177 (1979).
- 5) Rosen, G.: Role of chemotherapy in the management of bone and soft tissue sarcomas. In Coombs & G. Friedlaender (eds.), Bone Tumour Management, 1st ed., p280-294, Butterworths, London, 1987.
- 6) Rasheed, S., Nelson-Rees, W. A., Toth, E. M., Arnstein, P. & Gardner, M. B.: Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). Cancer, 33, 1027-1033 (1974).
- 7) 山崎安朗: ヒト骨肉腫由来細胞株の樹立とその形態学的観察. 十全医会誌, 71, 1-13 (1975).
- 8) Rhim, J. S., Park, D. K., Arnstein, P., Huebner, R. J., Weisburger, E. K. & Nelson-Rees, W. A.: Transformation of human cells in culture by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Nature, 256, 751-753 (1975).
- 9) Milan, S. B., Magnuson, V. L., Steffensen, B., Chen, D. & Klebe, R.: IL-1 β and prostaglandins regulate integrin mRNA expression. J. Cell. Physiol., 149, 173-183 (1991).
- 10) Rhim, J. S., Cho, H. Y. & Huebner, R. J.: Non-producer human cells induced by murine sarcoma virus. Int. J. Cancer, 15, 23-29 (1975).
- 11) Bloom, E. T.: Further definition by cytotoxicity tests of cell surface antigens of human sarcomas in culture. Cancer Res., 32, 960-967 (1972).
- 12) Sa'nchez, A., Chesterman, C. N. & Sleight, M. J.: Novel human PDGFA gene transcripts derived by alternative mRNA splicing. Gene, 98, 295-298 (1991).
- 13) Davis, L. G., Dibner, M. D. & Batty, J. F.: Basic Methods in Molecular Biology, 1st ed., p42-43, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 1986.
- 14) Endo, Y., Sasaki, T., Harada, F. & Noguchi, M.: Specific detection of metastasized human tumor cells in embryonic chicks by the polymerase chain reaction. Jpn. J. Cancer Res., 81, 723-726 (1990).

- 15) Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
- 16) Denhardt, D. J.: A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 641-646 (1966).
- 17) Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. & Mitchell, J. B.: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, **47**, 936-942 (1987).
- 18) Povlsen, C. O. & Rygaard, J.: Heterotransplantation of human adenocarcinoma of the colon and rectum to the mouse mutant nude. A study of nine consecutive transplantations. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **79**, 159-169 (1971).
- 19) 藤田昌英: ヒト癌-ヌードマウス系による抗癌剤感受性試験-前臨床2次スクリーニングとしての有用性. *KARKINOS*, **3**, 33-42 (1990).
- 20) Sharkey, F. E. & Fogh, J.: Metastasis of human tumors in athymic nude mice. *Int. J. Cancer*, **24**, 733-738 (1979).
- 21) Riccardi, C., Barlozzari, T., Santoni, A., Herberman, R. B. & Cesarini, C.: Transfer to cyclophosphamide-treated mice of natural killer (NK) cells and in vivo natural reactivity against tumors. *J. Immunol.*, **126**, 1284-1289 (1981).
- 22) Ewing, J.: *Neoplastic Disease: A Treatise on Tumors*, 3rd Ed., Chap. 4. p87-100, Saunders Inc., Philadelphia, 1928.
- 23) Paget, S.: The distribution of secondary growth in cancer of the breast. *Lancet*, **1**, 571-573 (1889).
- 24) Kyriazis, A. P., Dipersio, L., Michael, G. J., Pesce, A. J. & Stinnett, J. D.: Growth patterns and metastatic behavior of human tumors growing in athymic mice. *Cancer Res.*, **38**, 3186-3190 (1978).
- 25) Giavazzi, R., Campbell, D. E., Jessup, J. M., Cleary, K. & Fidler, I. J.: Metastatic behavior of tumor cells isolated from primary and metastatic human colorectal carcinomas implanted into different sites in nude mice. *Cancer Res.*, **46**, 1928-1933 (1986).
- 26) Morikawa, K., Walker, S. M., Jessup, J. M. & Fidler, I. J.: In vivo selection of highly metastatic cells from surgical specimens of different primary human colon carcinomas implanted into nude mice. *Cancer Res.*, **48**, 1943-1948 (1988).
- 27) Rodolfo, M., Balsari, A., Clemente, C., Parmiani, G. & Fossati, G.: Tumorigenicity and dissemination of primary and metastatic human melanomas implanted into different sites in nude mice. *Invasion Metastasis*, **8**, 317-331 (1988).
- 28) Akimaru, K., Stuhlmiller, G. M. & Seigler, H. F.: Human melanoma growth in the peritoneal cavity of the athymic mouse. A model for in vivo study of cell-mediated immunity. *J. Surg. Oncol.*, **17**, 309-320 (1981).
- 29) Cresson, D. H., Beckman, W. C., Tidwell, R. R., Geratz, J. D. & Siegal, G. P.: In vitro inhibition of human sarcoma cells' invasive ability by bis (5-amidino-2-benzimidazolyl) methane-A novel esteroprotease inhibitor. *Am. J. Pathol.*, **123**, 46-56 (1986).
- 30) Nanni, P., De Giovanni, C., Nicoletti, G., Del Re, B., Scotlandi, K. & Lollini, P. L.: Human rhabdomyosarcoma cells in nude mice as a model for metastasis and differentiation. *Invasion Metastasis*, **9**, 231-241 (1989).
- 31) Murphy, J. B.: Transplantability of malignant tumors to the embryos of a foreign species. *J. Am. Med. Assoc.*, **59**, 874-875 (1912).
- 32) Dagg, C. P., Karnofsky, D. A. & Roddy, J.: Growth of transplantable human tumors in the chick embryo and hatched chick. *Cancer Res.*, **16**, 589-594 (1956).
- 33) Vogel, H. B. & Berry, R. G.: Chorioallantoic membrane heterotransplantation of human brain tumors. *Int. J. Cancer*, **15**, 401-408 (1975).
- 34) Ossowski, L. & Reich, E.: Experimental model for quantitative study of metastasis. *Cancer Res.*, **40**, 2300-2309 (1980).
- 35) Chambers, A. F., Skafir, R. & Ling, V.: A model system for studying metastasis using the embryonic chick. *Cancer Res.*, **42**, 4018-4025 (1982).
- 36) Dexter, D. L., Lee, E. S., DeFusco, D. J., Libbey, N. P., Spemulli, E. N. & Calabresi, P.: Selection of metastatic variants from heterogenous tumor cell lines using the chicken chorioallantoic membrane and nude mouse. *Cancer Res.*, **43**, 1733-1740 (1983).
- 37) Dagg, C. P., Karnofsky, D. A., Toolan, H. W. & Roddy, J.: Serial passage of human tumors in chick embryo: growth inhibition by nitrogen mustard. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **87**, 223-227 (1954).
- 38) Harris, J. J.: The effect of NSC survey compounds on human tumors in embryonated eggs. *Cancer Res.*, **22**, 1-8 (1962).
- 39) Gitterman, C. O., Rickes, E. L., Wolf, D. E., Madas, J., Zimmerman, S. B., Stoudt, T. H. & Demny, T. C.: The human tumor-egg host system. IV. Discovery of a new antitumor agent, compound 593 A. *J. Antibiot.*, **23**, 305-310 (1970).
- 40) Terui, S.: Experimental study on drug sensitivity of the rat ascites hepatoma cells in embryonated eggs. *Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ.*, **22**, 10-17 (1975).
- 41) 佐々木琢磨: 鶏卵法による癌悪性度の判定と薬剤感受性試験. *ファルマシア*, **23**, 58-62 (1987).
- 42) Uchida, H., Sasaki, T., Tanaka, M., Endo, Y., Nitta, K., Nishikawa, K., Chuman, H., Fukuma, H. & Matsumoto, K.: Response to antitumor agents of murine transplantable tumors onto chorioallantoic membrane of chick embryo. *Jpn. J. Cancer Res.*, **78**, 729-736 (1987).
- 43) Nishikawa, K., Sasaki, T., Tanaka, M., Uchida, H., Endo, Y., Fukuma, H., Chumann, H., Beppu, Y., Matsumoto, K. & Nitta, K.: Experimental model for predicting metastatic ability of tumors using chick embryo. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **17**, 319-325 (1987).
- 44) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N.: Enzymatic

amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-1354 (1985).

45) Endo, Y., Seiki, M., Uchida, H., Noguchi, M., Kida, Y., Sato, H., Mai, M. & Sasaki, T.: Experimental metastasis of oncogene-transformed NIH 3T3 cells in chick embryo. *Jpn. J. Cancer Res.*, 83, 274-280 (1992).

46) Ballin, M., Gomez, O. E., Sinha, C. C. & Thorgeirsson, U. P.: Rasoncogene mediated induction of a 92kDa metalloproteinase: strong correlation with the malignant phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 154, 832-838 (1988).

47) Yamagata, S., Ito, Y., Tanaka, R. & Shimizu, S.: Gelatinases of metastatic cell lines of murine colonic carcinoma as detected by substrate-gel electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 151, 158-162 (1988).

48) Yamagata, S., Tanaka, R., Ito, Y. & Shimizu, S.: Gelatinases of murine metastatic tumor cells. *Biochem.*

Biophys. Res. Commun., 158, 228-234 (1989).

49) Sato, H., Kida, Y., Mai, M., Endo, Y., Sasaki, T., Tanaka, J. & Seiki, S.: Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene*, 7, 77-83 (1992).

50) Kondo, T., Imamura, T. & Ichihashi, H.: In vitro test for sensitivity of tumor to carcinostatic agents. *Gann*, 57, 113-121 (1966).

51) Karnofsky, D. A.: Differences between cancers in terms of therapeutic responses. *Cancer Res.*, 16, 687-697 (1956).

52) Chambers, A. F., Schmidt, E. E., MacDonald, I. C., Morris, V. L. & Groom, A. C.: Early steps in hematogenous metastasis of B16F1 melanoma cells in chick embryos studied by high-resolution intravital videomicroscopy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 84, 797-803 (1992).

Chick Embryo Assay as a Chemosensitivity Test for Metastasized Human Bone and Soft Tissue Tumor Cells
Yasutaka Takagi, Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med Soc., 102, 391—403 (1993)

Key words human bone and soft tissue tumor cell, metastasis, polymerase chain reaction, chemosensitivity test, chick embryo

Abstract

Improved therapeutic effectiveness for patients with human bone and soft tissue tumor cells requires the development of more effective treatments for primary tumors and also metastasis. In this study, the usefulness of chick embryo assay as a chemosensitivity test for primary tumors and metastasis of human bone and soft tissue tumor cells was demonstrated. Seven kinds of human bone and soft tissue tumor cell lines were examined for their metastatic tendencies using embryonic chicks. The cells (1×10^6 cells/egg) were inoculated into the chorioallantoic membrane (CAM) vein of 10-day-old fertilized eggs. The embryonic chicks were sacrificed 7 days after tumor cell inoculation and DNA was extracted from the lungs and the livers. The DNA ($1 \mu\text{g}$) was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) with the specific primers for the human β -globin gene (576 bp) and the reaction products were analysed by Southern blotting. Histopathological findings were also examined. Many metastatic cells of HT-1080 fibrosarcoma cells, MNNG/HOS osteosarcoma cells and SK-ES-1 osteosarcoma cells in embryonic organs were detected by using this method. Antitumor drugs were injected into the CAM veins 3 days after tumor inoculation. Three metastasized human tumor cells showed high sensitivity to ADM ($40 \mu\text{g/egg}$) and MMC ($20 \mu\text{g/egg}$) but showed different sensitivities to CDDP ($10 \mu\text{g/egg}$), CPM ($250 \mu\text{g/egg}$) and VLB ($1 \mu\text{g/egg}$). SK-ES-1 showed high sensitivity to VLB ($1 \mu\text{g/egg}$). MNNG/HOS did not show sensitivities to CDDP ($10 \mu\text{g/egg}$), CPM ($250 \mu\text{g/egg}$) and VLB ($1 \mu\text{g/egg}$). The histopathological findings of the metastasis of embryonic livers and lungs exhibited the same results as that of the PCR method. For the inhibition of metastasis, the effects of antitumor drugs at an early stage of metastasis were examined. MMC and VLB were injected at 2hrs, day 1 and day 3. The inhibition ratios of MMC in MNNG/HOS cells were 91.9% (2hrs), 83.2% (day 1) and 51.8% (day 3), respectively. The inhibition ratios of VLB in MNNG/HOS cells were -2.2% (2hrs), and 10.4% (day 3). These results demonstrated that the injection of appropriate drugs at an early stage after tumor cell inoculation was effective in preventing metastasis. With the presented assay system using the PCR technique, an experimental model for metastasis of human bone and soft tissue tumor cells and a model for chemotherapy of metastasis has been established. It is thus considered that chick embryo assay could be useful for elucidating the mechanisms of metastasis and invasion of human bone and soft tissue tumor cells and should contribute to the development of new chemotherapy methods for them.